昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*，July 2008，51(7)：681 - 688　　ISSN 0454-6296

甜菜夜蛾羧酸酯酶基因 cDNA 的克隆、表达及序列分析

张　霞[1,2]，郭　巍[1,*]，李国勋[1,3]，宋水山[2]

（1. 河北农业大学生命科学学院/河北省农作物病虫害生物防治工程技术中心，河北保定　071000；
2. 河北省生物研究所，石家庄　050051；3. 青岛农业大学，山东青岛　266109）

摘要：羧酸酯酶是昆虫体内重要的解毒酶系之一，与昆虫抗药性产生相关。利用粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni*（Hübner）肠粘蛋白多克隆抗体免疫筛选甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*（Hübner）中肠 cDNA 表达文库，得到编码羧酸酯酶的全长 cDNA 克隆。该 cDNA 克隆全长 1 812 bp（GenBank 登录号 EF580101），开放阅读框长 1 605 bp，编码 535 个氨基酸。该蛋白活性中心包括 3 个氨基酸残基（催化三联体）：Ser186，Glu319 和 His443，3 个 N-联糖基化位点，具备羧酸酯酶的结构特征，属羧酸酯酶家族（EC：3.1.1.-）。将该基因与 pQE30 载体重组，经 IPTG 诱导，spot-blot 鉴定，蛋白获得了表达；以 α-醋酸萘酯为底物，检测表达的羧酸酯酶活性为 1.3 nmol/100 μL 酶液。

关键词：甜菜夜蛾；cDNA 表达文库；羧酸酯酶；表达；spot-blot 鉴定

中图分类号：Q965.9　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2008)07-0681-08

Cloning, expression and sequence analysis of carboxylesterase gene from *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)

ZHANG Xia[1,2], GUO Wei[1,*], LI Guo-Xun[1,3], SONG Shui-Shan[2] (1. College of Life Sciences, Agricultural University of Hebei/Biological Control Centre of Plant Pathogens and Plant Pests of Hebei Province, Baoding, Hebei 071001, China; 2. Biological Institute of Hebei, Shijiazhuang 050051, China; 3. Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China)

Abstract: Carboxylesterases are associated with insecticide-resistance and play an important role in the detoxification of many agrochemicals. Using the polyclonal antiserum against *Trichoplusia ni* (Hübner) invertebrate intestinal mucin (IIM), a carboxylesterase gene SeC1 was screened from the cDNA expression library of *Spodoptera exigua* (Hübner) midgut. The full-length of SeC1 is 1 812 bp (GenBank accession no. EF580101), and the open reading frame encodes 535 amino acids. The *SeC*1 possesses a catalytic triad, consisting of a Ser, a His and a Glu residue (Ser186, His443 and Glu319), which is characterized by carboxylic esters (EC: 3.1.1.-). The SeC1 gene has been recombined into pQE30 vector. The spot-blot analysis demonstrated that SeC1 protein was expressed at a low level after being induced by IPTG. The activity for Sec1 was 1.3 nmol/100 μL enzyme buffer with the α-NA as substrate.

Key words: *Spodoptera exigua*; cDNA expression library; carboxylesterase; expression; spot-blot analysis

羧酸酯酶广泛分布于多种组织中，能有效地催化含酯键、酰胺键和硫酯键的内源性和外源性化合物水解（Yan *et al*., 1995；Miyazaki *et al*., 2003；Tomomi *et al*., 2004）。羧酸酯酶是昆虫体内重要的解毒酶系之一，不仅与昆虫抗药性有关，而且可减轻或使昆虫免受来自植物次生物质的毒害，从而增强昆虫对不同品种植物的适应性。众多科学家对来自不同昆虫的羧酸酯酶与昆虫抗药性的关系进行了研究，发现许多昆虫如桃蚜 *Myzus persicae*，库蚊 *Culex quinquefasciatus* 以及褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 等对有

基金项目：国家重点基础研究发展规划（“973”计划）项目（2003CB114201）；河北省自然科学基金项目（C2007000542）

作者简介：张霞，女，1978 年生，河北高邑人，博士研究生，助理研究员，主要从事农业病虫害生物防治研究，Tel.：0312-7528170；E-mail：zxx7812@126.com；zxx7812@hotmail.com

* 通讯作者 Author for correspondence，Tel.：0312-7528178；Email：guowei_hbau@yahoo.com.cn；guowei@hebau.edu.cn

收稿日期 Received：2008-01-22；接受日期 Accepted：2008-06-03

机磷杀虫剂产生抗性是由于羧酸酯酶（CarE，EC3.1.1.1.1）基因的过量表达导致其活性增加所致（Devonshire，1977；Mouches *et al*.，1990；Vaughan and Hemingway，1995；Vaughan，1997；Karunaratne *et al*.，1999）；Wirth等的研究也表明，对有机磷杀虫剂产生抗性的昆虫中，其抗药性与羧酸酯酶有较大的相关性，抗性越强羧酸酯酶的活力越高（Villani *et al*.，1983；Wirth *et al*.，1990；Sreerama and Veerabhadrappa，1991；Whyard *et al*.，1994，1995）。但在另一些昆虫中，对有机磷农药抗性品系的羧酸酯酶活力反而低于敏感品系的羧酸酯酶活力，研究发现其抗性品系羧酸酯酶基因的结构发生了改变（Carmbell *et al*.，1998；Claudianos *et al*.，1999；郭惠琳和高希武，2005）。这是目前普遍认为和昆虫抗性相关的导致羧酸酯酶活力的改变的两种机制，即羧酸酯酶基因的扩增和结构基因的改变。国内对于羧酸酯酶的研究也有较大进展（郭惠琳和高希武，2005；高贵田等，2006），但主要集中在对昆虫羧酸酯酶的生化特性分析，而在分子水平上对于全长的昆虫羧酸酯酶的结构和功能研究很少（高贵田等，2006，2007；宋宏图等，2007；陈茂华等，2006）。截止到目前，国内外尚未见到甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*（Hübner）羧酸酯酶的相关报道。

甜菜夜蛾属鳞翅目夜蛾科，是一种具有食性杂、为害广、抗性强、繁殖快等特点的世界性害虫。20世纪90年代以后，甜菜夜蛾对有机磷杀虫剂表现出抗药性（张悦丽和高兴祥，2004）。本实验室在筛选甜菜夜蛾中肠cDNA文库过程中，得到了编码羧酸酯酶基因的阳性克隆，并分析该基因序列特征，为研究羧酸酯酶的高级结构和功能，以及昆虫抗药性方面的工作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 培养基：LB Broth，LB Agar，NZY Broth，NZY Agar，NZY Top Agar，LB with Supplements 参见 ZAP-cDNA® Gigapack® Ⅲ Gold Cloning Kit 说明书。

1.1.2 试剂：NBT，BCIP（Bio Basic Inc.），购自上海生工生物工程有限公司；粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni*（Hübner）肠粘蛋白特异性多克隆抗体（IIM-specific polyclonal antiserum），由美国康奈尔大学 Wang P 博士惠赠；anti-rabbit IgG（alkaline phosphatase conjugate antibody developed in goat）（Sigma），购自博士德生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 常规分子生物学操作：质粒DNA的提取，酶切鉴定，琼脂糖凝胶电泳，连接，转化，大肠杆菌感受态细胞的制备等，参见分子克隆实验指南（J. 萨姆布鲁克等，1999）。

1.2.2 甜菜夜蛾中肠cDNA文库的筛选：解剖甜菜夜蛾幼虫，提取总RNA，纯化得到mRNA，利用Stratagene公司cDNA Synthesis Kit及ZAP-cDNA Gigapack Ⅲ Gold Cloning Kit，构建其中肠cDNA表达文库。参照pico BlueTM Immunoscreening Kit（Stratagene，La Jolla，CA）方法，用粉纹夜蛾肠粘蛋白多克隆抗体（IIM-specific polyclonal antiserum）从cDNA表达文库中筛选IIM cDNA克隆。将膜在含1% BSA（牛血清白蛋白）的TBS中封闭，第一抗体（IIM-specific polyclonal antiserum）以1∶5 000，二抗（羊抗兔AP）以1∶30 000稀释，以NBT/BCIP显色约20 min。将膜在流水中漂洗，避光干燥，保存。第一轮筛选应保证有高滴度（每15 cm平板约生长50 000个噬菌斑），然后挑取阳性噬菌斑进行第二轮低密度的筛选（每9 cm平板约生长30～100个噬菌斑）。最后挑取第二轮筛选的阳性噬菌斑，根据ZAP-cDNA Gigapack cloning kit操作步骤将pBluescript（r）SK（-）phagemid（Stratagene，La Jolla，CA）进行切除。

1.2.3 DNA的测序及序列分析：将切除的cDNA阳性克隆提取质粒，进行限制性酶切分析，挑取酶切产物不同的克隆进行测序分析。用T3和T7引物进行cDNA双向测序，该cDNA插入片断连接在pBluescript® SK（-）载体上，使用DNAMAN软件包和BLAST数据库搜索程序进行DNA和氨基酸序列分析和数据库搜索。

1.2.4 重组表达载体pQE30-SeC1的构建：*Bam*HⅠ和*Kpn*Ⅰ双酶切cDNA阳性克隆SeI66，琼脂糖凝胶电泳回收1.7 kb的羧酸酯酶基因片段，与*Bam*HⅠ/*Kpn*Ⅰ双酶切pQE30载体的回收产物进行连接，转化大肠杆菌 *Escherichia coli* M15，在LB抗性平板（含100 μg/mL氨苄青霉素）上筛选重组子。提取质粒DNA，进行*Bam*HⅠ和*Kpn*Ⅰ双酶切鉴定。

1.2.5 羧酸酯酶重组蛋白的诱导表达及spot-blot鉴定：接种鉴定正确的重组子于相应抗生素的LB液体培养基（含100 μg/mL氨苄青霉素）中，37℃过夜培养，然后以1%的比例转接于新鲜的含相应抗生素的LB液体培养基中，37℃振荡培养2.5 h，加入IPTG至终浓度1 mmol/L。诱导表达不同时间，进行

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）和 spot-blot 鉴定。

1.2.6　羧酸酯酶活性的测定：IPTG 诱导表达重组羧酸酯酶，离心收集菌体，溶于 1/10 体积的 PBS，超声波破碎后，离心，取上清，此为制备的酶液。以 α-醋酸萘酯为底物，通过显色反应，用分光光度计在 600 nm 处测 OD 值。根据 30 min 内生成的 α-醋酸萘酚的毫摩尔数表示酶的活性（宋宏图，2007）。

2　结果与分析

2.1　cDNA 文库的筛选及 SeC1 基因序列分析

用粉纹夜蛾肠粘蛋白多克隆抗体，免疫筛选甜菜夜蛾中肠 cDNA 表达文库，经过两轮筛选，获取阳性噬菌斑，进行切除，测序。将获得的序列通过 BLAST（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast）进行相似性分析。筛选得到阳性克隆 SeI66，命名为 *SeC*1 基因，GenBank 登录号为 EF580101。利用 DNAMAN 软件对该基因进行核苷酸序列分析显示，该基因全长 1 812 bp，开放阅读框（ORF）长 1 605 bp，编码 535 个氨基酸（图 1）。推导的蛋白质分子量为 60 kDa，等电点 pI 为 5.31。5′端具 47 bp 的非翻译区和起始密码子 ATG；3′端有 160 bp 的非编码区，含终止密码子，在 polyA 末端上游 29 bp 处有一个多聚腺苷酸终止信号序列 AATTAA。利用 Prosite 数据库（http://www.expasy.ch/prosite/）进行保守结构域搜索（Sarauer *et al*., 2003），该基因编码产物与酯酶和脂肪酶（包括真菌脂肪酶，胆碱酯酶等）同源性最高，属羧酸酯酶家族（EC：3.1.1.-），其活性中心包括以丝氨酸（Ser186）为中心的 3 个氨基酸残基（催化三联体）：Ser186，Glu319 和 His443。甜菜夜蛾羧酸酯酶 SeC1 有 3 个 N-糖基化位点：N179，N277，N346（图 1）。半胱氨酸残基有 6 个，分别位于第 81，144，217，403，418 和 442 位。

2.2　SeC1 与几种昆虫羧酸酯酶氨基酸序列的比较分析

比较分析甜菜夜蛾 *S. exigua*，斜纹夜蛾 *S. litura*，棉铃虫 *Helicoverpa armigera*，桑蚕 *Bombyx mori*，野桑蚕 *Bombyx mandarina*，象虫金小蜂 *Anisopteromalus calandrae*，埃及伊蚊 *Aedes aegypti*，赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 和黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的羧酸酯酶氨基酸序列，发现它们之间的同源性较低，尤其是羧基端的氨基酸序列保守性低，但其靠近 5′端的活性中心处的序列则高度保守（图 2）。这与前人的研究结果一致（郭惠琳和高希武，2005；高贵田等，2006）。

将甜菜夜蛾羧酸酯酶氨基酸序列与部分已知昆虫的羧酸酯酶氨基酸序列进行比对，利用 DNAMAN 软件构建进化树，结果如图 3 所示：鳞翅目夜蛾科的斜纹夜蛾和甜菜夜蛾之间的同源性比斜纹夜蛾和棉铃虫之间的同源性高，这同他们在分类地位上的亲缘关系远近是基本一致的。同样，鳞翅目蚕蛾科的羧酸酯酶也聚到这一大类。在分类地位上亲缘关系较远的鞘翅目拟步甲科的赤拟步甲和双翅目蝇科的果蝇则分别单独聚为一类。

2.3　羧酸酯酶重组载体的构建和表达

将羧酸酯酶基因 *SeC*1 克隆到 pQE30 载体，构建重组表达载体 pQE30-SeC1，转化大肠杆菌 M15。挑取重组子，提取质粒 DNA，利用 *Bam*H Ⅰ 和 *Kpn* Ⅰ 双酶切进行鉴定。琼脂糖凝胶电泳结果表明，重组质粒 pQE30-SeC1 被 *Bam*H Ⅰ 和 *Kpn* Ⅰ 双酶切为 3.4 kb 的载体片段和 1.7 kb 的羧酸酯酶基因片段，重组表达载体构建成功。

接种鉴定正确的重组子，加入 IPTG 诱导蛋白表达。将培养物滴加到硝酸纤维素（NC）膜上，在室温下使蛋白与之结合，以粉纹夜蛾肠粘蛋白多克隆抗体为一抗，羊抗兔 IgG 为二抗，进行 spot-blot 鉴定。结果如图 4 所示，大肠杆菌 M15 作为阴性对照，棉铃虫肠粘蛋白 HaIIM（GenBank 登录号 EU136045）作为阳性对照，结果表明从 cDNA 文库中筛到的菌株 SeI66 和构建的重组表达菌株 M15（pQE-SeC1）印迹结果均呈阳性，而 SeI66 和重组菌株的上清均呈阴性，说明 SeC1 在 *E. coli* M15 中成功表达。但是 SDS-PAGE 结果显示诱导 2，4，6，8，10 h 后并未见 SeC1 的大量表达（结果未列出）。

2.4　羧酸酯酶的活性

以 α-醋酸萘酯为底物，测定原核系统表达的羧酸酯酶活性约为 1.3 nmol/100 μL 酶液。

3　讨论

真核生物有多种酯酶（esterases），其中有一类作用于羧酸酯的酯酶（carboxyl-esterases）（EC3.1.1.-）。依据羧酸酯酶被有机磷酸酯抑制模式不同，羧酸酯酶被划分为 3 类（A，B 和 C 类）。大多数羧酸酯酶在进化上是相关的，根据 ScanProsite 软件分析，B 族羧酸酯酶有 2 个保守结构域，1 个是丝氨酸活性中心 F-［GR］-G-x（4）-［LIVM］-x-［LIV］-x-G-x-S-［STAG］-G，

```
1     GTGACCGTTGCGGACGTTGTGACCGAGTGCACAGTACTGAATTCATGATGGTACAAGTGAAAGTCAGTGAGGGACTGCTGGAGGGAGAGC
1                                                    M  V  Q  V  K  V  S  E  G  L  L  E  G  E
91    GAGTGGACAACCCGTACGGAGGGTCCTACTTCAGCTTCAAGGGAATACCGTACGCGCAGCCACCTGTAGGAGATCTACGGTTCAAGGCAC
15    R  V  D  N  P  Y  G  G  S  Y  F  S  F  K  G  I  P  Y  A  Q  P  P  V  G  D  L  R  F  K  A
181   CAGTACCTCCAAAGTCGTGGAATGGAGTTCGTTCTGCCAAGGAATTCGGACCAAAATCATATCAGAACGACATCTTTATGAATGTCGGAA
45    P  V  P  P  K  S  W  N  G  V  R  S  A  K  E  F  G  P  K  S  Y  Q  N  D  I  F  M  N  V  G
271   GAGTTGGCGAAGAAGATTGTTTGTACCTGAACGTGTACACGCCATCAACAAAACCGGACAAGCCTTTACCAGTCATGTTCTGGATACATG
75    R  V  G  E  E  D  C  L  Y  L  N  V  Y  T  P  S  T  K  P  D  K  P  L  P  V  M  F  W  I  H
361   GAGGAGGTTTCTTCAGCGGCAGTGGTAACGATGATCTTTATGGGCCAGAGTTACTTGTCAGACACGATGTCGTCCTTGTCACCTTCAACT
105   G  G  G  F  F  S  G  S  G  N  D  D  L  Y  G  P  E  L  L  V  R  H  D  V  V  L  V  T  F  N
451   ATAGAGTAGATGTGCTCGGCTTTCTTTGTTTAGACACAGAGGATGTTCCTGGCAACGCAGGTATGAAAGACCAGGTACAAGCTCTCAGAT
135   Y  R  V  D  V  L  G  F  L  C  L  D  T  E  D  V  P  G  N  A  G  M  K  D  Q  V  Q  A  L  R
541   GGGTGAACAAAAACATTGCTAACTTCGGTGGTGACCCGAAAAATATAACCATATTTGGTGAAAGTGCTGGAGGAGCTAGTGTCAGTTATC
165   W  V  N  K  N  I  A  N  F  G  G  D  P  K  N  I  T  I  F  G  E  S  A  G  G  A  S  V  S  Y
631   ACTTAATATCTCCAATGTCAAAGGGCTTATTTAAGAGGGCCATTGCTCAGAGTGGAGCATCTACTTGCCCCTGGGCCCAAGCTGTTGAGC
195   H  L  I  S  P  M  S  K  G  L  F  K  R  A  I  A  Q  S  G  A  S  T  C  P  W  A  Q  A  V  E
721   CTCGTGAAAGAGCTTTAGCATTAGCCAGAGCCTGGGATTTTATCAGAGATGATAAAGATTTGTATGATTTTTTCAAAAAACAGCCGATGG
225   P  R  E  R  A  L  A  L  A  R  A  W  D  F  I  R  D  D  K  D  L  Y  D  F  F  K  K  Q  P  M
811   AATCAATAGTTGGAGTTCCCGTAACGGTAGCAATGTTTGAAGCTTTCAAGGGTGGAATAGACGTAAATTTCACTGTAGTCAACGAAAAGA
255   E  S  I  V  G  V  P  V  T  V  A  M  F  E  A  F  K  G  G  I  D  V  N  F  T  V  V  N  E  K
901   AATTTGGAGACAATGAGAGATTCTTTTATGGAGACATGGTTGATGCAGTGTCAAATGGTGTTCATGAAGGAGTAGAAATAATGACGGGGA
285   K  F  G  D  N  E  R  F  F  Y  G  D  M  V  D  A  V  S  N  G  V  H  E  G  V  E  I  M  T  G
991   SCACTACAGAAGAAGGTCTCATTGCTATGGGAGACCTTGAAGCCACTAAGAAGGTTTTGGAAATGGCAAAAACGTTCCCAGAAATGTTTG
315   X  T  T  E  E  G  L  I  A  M  G  D  L  E  A  T  K  K  V  L  E  M  A  K  T  F  P  E  M  F
1081  TCAATAAATCGGAAGCATTCTATTTGCCCTTGAAGGAGCAGCTTAAGATAGGGAAAGAAATCAGGAATTTTTATTTCAATGACCAGGTGA
345   V  N  K  S  E  A  F  Y  L  P  L  K  E  Q  L  K  I  G  K  E  I  R  N  F  Y  F  N  D  Q  V
1171  ACATCCCAGATGATTGGGATAAGTTGATGAATTTCTTTTCGATGCAGATGTTCATACACTCGTCAATGAAATGGGTAAAATACTGTGCAC
375   N  I  P  D  D  W  D  K  L  M  N  F  F  S  M  Q  M  F  I  H  S  S  M  K  W  V  K  Y  C  A
1261  AAGCGAAGAAGCACAAACTATACTTGTATAAATTTTCTTGTAAATCAGAGAGGAACGTTATTGCTGTCTTGAGAGGTCAGGCAGAAATGT
405   Q  A  K  K  H  K  L  Y  L  Y  K  F  S  C  K  S  E  R  N  V  I  A  V  L  R  G  Q  A  E  M
1351  TGGGAAACCGACAAGTTACTTGTCATGCTGATGAACTAACGTATCTTTTTAACCCTAAACTGATGCCAAAGGTGGACACTGCTTCTTCGA
435   L  G  N  R  Q  V  T  C  H  A  D  E  L  T  Y  L  F  N  P  K  L  M  P  K  V  D  T  A  S  S
1441  CGTTTGAAATGATGGAAAGATTGTTGAAACTTTGGACAAACTTCGCTAAATATGGAAACCCAACTCCAGACGATTCCCTGGGCGCTAAGT
465   T  F  E  M  M  E  R  L  L  K  L  W  T  N  F  A  K  Y  G  N  P  T  P  D  D  S  L  G  A  K
1531  GGGCACCGTATACTCTAGAAAACCAAGAATATCTGGACATTGGAAGCGAGCTGAAAGCGGGGACTGCGCCAGATGCTGAGGAAACACAAT
495   W  A  P  Y  T  L  E  N  Q  E  Y  L  D  I  G  S  E  L  K  A  G  T  A  P  D  A  E  E  T  Q
1621  TCTGGGATAAATTGTATGAAAGATATGGACTGTGAATAGGATTTTGAAATAAATTTTACAATATCCATGTTAGGGTGAAATGTTTTGGGT
525   F  W  D  K  L  Y  E  R  Y  G  L  * 535
1711  TAAAATTACAATAATTAAATATTGATTTGTAATTTTAATGATATTGGAATTAAACTTAAATATTATTTAATTAATTACAGACTAAAAAAA
1801  AAAAAAAAAAAA   1812
```

图 1　编码羧酸酯酶 SeC1 的 cDNA 核苷酸序列及其推导的氨基酸序列(GenBank 登录号 EF580101)

Fig. 1　Nucleotide sequence of the cDNA for SeC1 and its deduced amino acid sequence (GenBank™ accession number is EF580101)

标有双下划线的序列为起始密码子 ATG 和终止密码子 TGA；方框内为多聚腺苷酸信号序列 AATTAA；阴影所示字体为 6 个编码的半胱氨酸残基；下划线所示为 *N*-糖基化位点。 The translation initiation codon ATG and stop codon TGA are double underlined. The potential polyadenylation signal sequence is indicated in boxes. Six cysteine residues are shaded. Three putative *N*-glycosylation sites are underlined.

另 1 个是二硫键形成的位点：[EDA]-[DG]-C-L-[YTF]-[LIVT]-[DNS]-[LIV]-[LIVFYW]-x-[PQR] (其中‘[ ]’表示不同物种在该位点是其中的 1 个氨基酸)。甜菜夜蛾羧酸酯酶 SeC1 具有羧酸酯酶的保守结构域：1 个丝氨酸活性中心“FGGdpknItIfGeSAG”和 1 个二硫键形成的位点“EDCLYLNVYtP”(其中小写字母代表的是 x 位置的氨基酸)(图 2)。依据氨基酸序列同源性分析和保守结构域分析，本研究中分离得到的羧酸酯酶 SeC1 属于 B 类羧酸酯酶，推导的蛋白质分子量为 60 kDa，等电点 pI 为 5.31。

哺乳动物肝等羧酸酯酶及羧酸酯酶亚基分子量大约 56～64 kDa，等电点在 4.7～6.5 间变化，大多数酶都是含甘露糖的糖蛋白(Santoh and Hosokawa，1995)。羧酸酯酶的一级结构不仅与其活性位点的形成有关，而且与酶的亚细胞定位及底物特异性均有密切关系(Miller *et al*.，1999)。羧酸酯酶的氨基酸组成高度保守，其共同特征是(滕霞和孙曼霁，2003)：属于丝氨酸酯酶的羧酸酯酶，Ser203，Glu335 和 His448 残基构成该酶的催化中心(Delroisse *et al*.，2005)；分子内均有 4～5 个半胱氨酸残基(Cys)，构成两对二硫键以维持活性中心的空间构型；近 N 端有一糖基化位点。糖基化程度与酶的活性呈正相关，说明该糖基化位点可能与酶的稳定性或活性位点的空间结构有关；C 末端序列 His-Xxx-Glu-Leu (HXEL)是羧酸酯酶在内质网腔潴留的

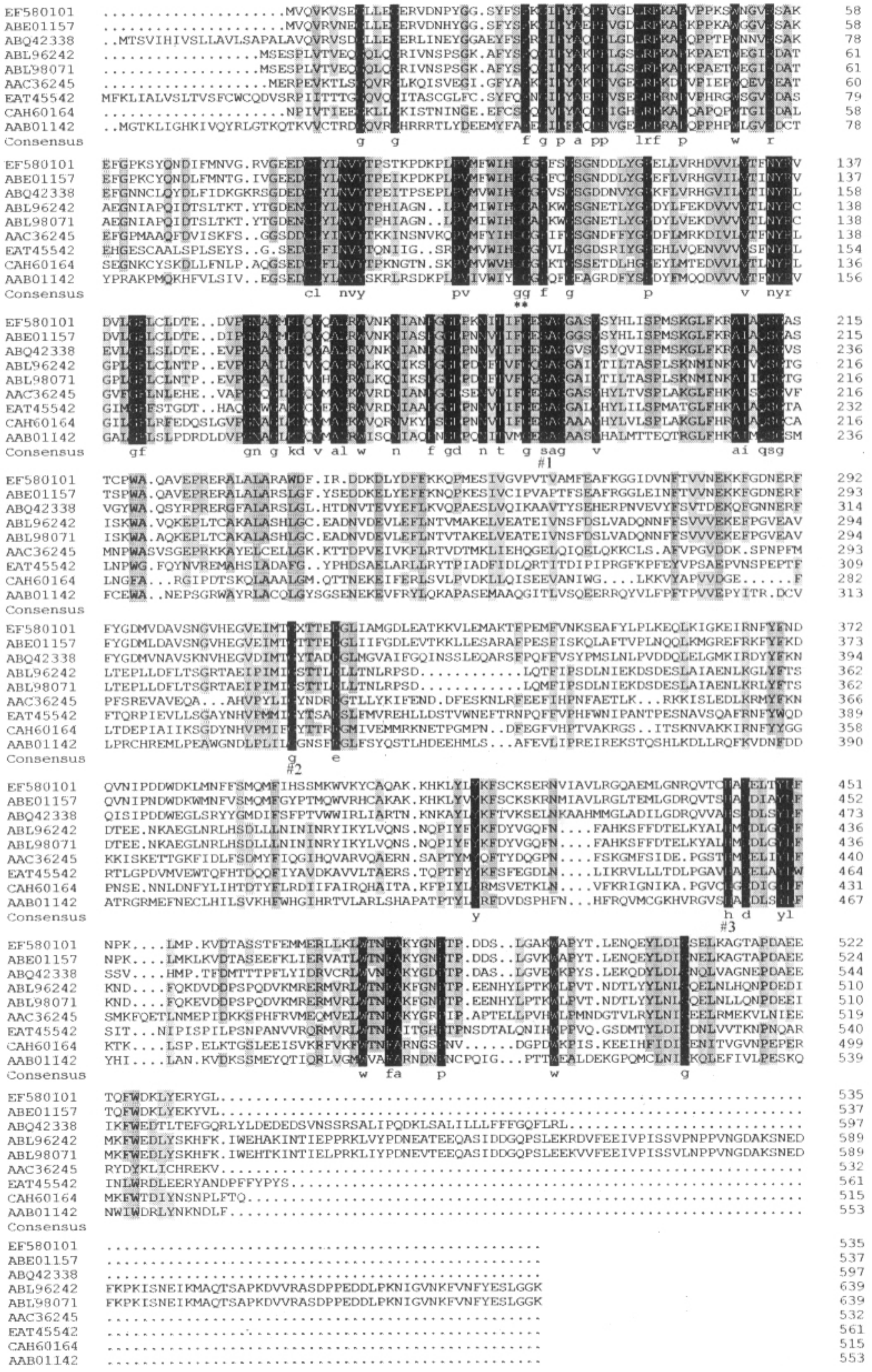

图 2　羧酸酯酶 SeC1 与已知昆虫羧酸酯酶氨基酸序列比对；

Fig. 2　Alignment of the carboxylesterases from known insects.

EF580101：Carboxylesterase（*Spodoptera exigua*）；AAB01142：Alpha-esterase（*Drosophila melanogaster*）；AAC36245：Carboxylesterase（*Anisopteromalus calandrae*）；ABE01157：Carboxylesterase（*Spodoptera litura*）；ABL96242：Carboxylesterase（*Bombyx mori*）；ABL98071：Carboxylesterase（*Bombyx mandarina*）；ABQ42338：Carboxylesterase（*Helicoverpa armigera*）；CAH60164：Esterase（*Tribolium castaneum*）；EAT45542：Carboxylesterase（*Aedes aegypti*）；**：Gly105-106；# 1，# 2，# 3：Ser186，Glu319 and His443，conserved catalytic triad.

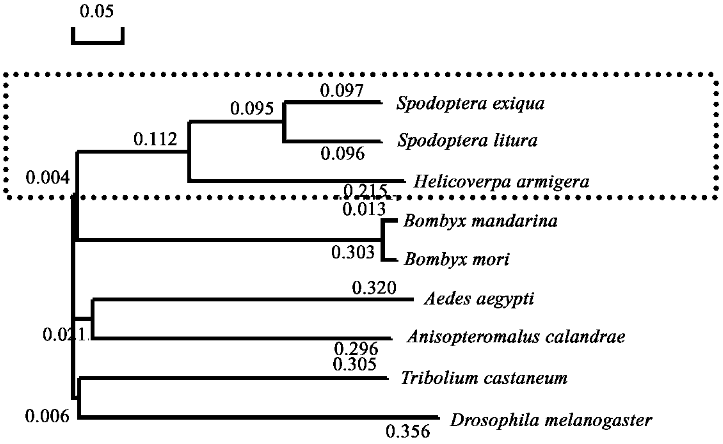

图 3　已知昆虫羧酸酯酶间同源性进化树

Fig. 3　Dendrogram shows the relationship among carboxylesterases from known insects

方框内为聚到一类的鳞翅目昆虫羧酸酯酶 Carboxylesterases from Lepidoptera formed a closer group（in box）.

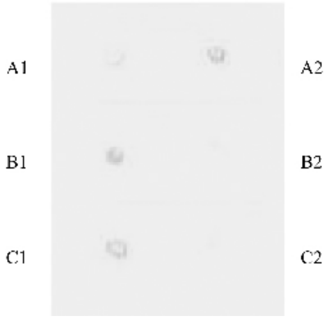

图 4　Spot-blot **检测** SeC1 **基因在** *E. coli* **中的表达**

Fig. 4　Expression of SeC1 gene in *E. coli* by spot-blot

A1：M15（CK－）；A2：HaIIM（CK＋）；B1：SeI66（cell）；B2：SeI66（supernatant）；C1：M15（pQE30-SeC1）（cell）；C2：M15（pQE30-SeC1）（supernatant）.

信号，该信号和内质网潴留受体（ERD2）共同作用保证内质网蛋白的潴留。本研究得到的甜菜夜蛾羧酸酯酶 SeC1，催化中心的序列是 Ser186，Glu319 和 His443；有 6 个半胱氨酸残基，分别位于第 81，144，217，403，418 和 442 位；3 个 N-糖基化位点（N179，N277，N346）。据报道，一般羧酸酯酶的近 N 端有一糖基化位点，糖链对糖苷酶 H 非常敏感，提示含甘露糖较多。糖基化程度与酶的活性呈正相关，说明该糖基化位点可能与酶的稳定性或活性位点的空间结构有关（Craig *et al*.，2005）。

蚊虫羧酸酯酶 A2 与蚜虫和人类的一些酯酶不同，它既无信号肽序列，也无糖基化修饰；一级结构中共有 9 个 Cys，大部分为其他酯酶所没有，5 个 Cys 与形成二硫键无关（Vaughan and Hemingway，1995）。在甜菜夜蛾羧酸酯酶序列中，其催化中心的序列是 Ser186，Glu319 和 His443；同蚊虫羧酸酯酶一样，无信号肽序列；但是有 3 个 *N*-联糖基化位点（N179，N277，N346），可能与酶的稳定性或活性位点的空间结构有关。此外，甜菜夜蛾的羧酸酯酶分子内有 6 个半胱氨酸残基，N 末端的半胱氨酸（第 81 位半胱氨酸残基）形成二硫键以维持活性中心的空间构型。而在围食膜蛋白如 CBP，IIM 中都含有数目不等的几丁质结合功能域（CBD），每一个 CBD 都由空间上保守的 6 个半胱氨酸形成 3 对二硫键，从而形成稳定的几丁质结合结构（Wang and Granados，1997）。可能正是由于这种空间结构的相似性使得粉纹夜蛾肠粘蛋白的特异性多克隆抗体能够识别羧酸酯酶。

有研究表明，羧酸酯酶、乙酰胆碱酯酶、丁酰胆碱酯酶、胆固醇酯酶的催化中心的序列（Glu，His，Ser）是高度保守的，是精氨酸水解酶超家族的一个共同结构，在水解内源性和外源性化合物时起作用（Craig *et al*.，2005）。其催化机理是：羧酸酯酶的 Ser203、Glu335 和 His448 组成催化中心（第 221 位的色氨酸，468 位的组氨酸，和 354 位的谷氨酸构成人羧酸酯酶的电荷中继网），Gly123－124 可能是氧离子洞的组成成分。近来，Stok 等（2004）研究发现一个可能起催化作用的第 4 个丝氨酸残基。羧酸酯酶通过一个两步反应裂解酯类，包括一个媒介物——酰基化酶的形成与降解反应。一个质子从组氨酸转移到丝氨酸，使得丝氨酸末端羟基基团的亲核性增加，反过来组氨酸结合氢形成谷氨酸的稳定性也增强。丝氨酸的亲核基团攻击其底物酯的失电子的羰基，形成一个四面体结构的中间物，氧离子洞中两个甘氨酸残基使它稳定。这个中间物裂解形成一个酰基化酶复合物，释放这个丝氨酸和底物中乙醇基团。然后一个组氨酸激活的水分子攻击这个酰基化酶复合物，重复上面的反应步骤，释放底物中的酸。此

外，保守的丝氨酸残基为谷氨酸的空间位置提供结构上的支持，从而来稳定这个催化三联体。在甜菜夜蛾羧酸酯酶序列中，其催化中心的序列是 Ser186，Glu319 和 His443；取代 Gly123 – 124 的是 Gly105 – 106。

本研究利用本实验室构建的甜菜夜蛾中肠 cDNA 表达文库筛选出羧酸酯酶基因 *SeC*1，应用 pQE30 表达载体成功与羧酸酯酶基因进行重组。IPTG 诱导后，经印迹分析可以看到有重组蛋白表达，尽管表达量小，但它具有羧酸酯酶的活性，能够水解 α-醋酸萘酯。这对羧酸酯酶的应用具有理论意义。羧酸酯酶基因的克隆和表达，为其纯化和进一步培养结晶，求解酯酶三维结构奠定了基础。只有了解酯酶的三维结构才能设计新型杀虫药剂，增加其抑制该酶活性中心的水解能力，增强其杀虫效力。近来有文献表明，抗性昆虫可以通过改变酯酶结构来增强其对杀虫药剂的降解能力（Stok，2004）。这又预示我们可以通过改变酯酶的特定部位来增强其对杀虫药剂的降解效力，消除杀虫药剂对环境的污染。而羧酸酯酶的表达及序列的特征分析为这些研究提供了良好的试验及理论基础。

参考文献（References）

Carmbell PM，Newcomb RD，Russell RJ，Oakeshott JG，1998. Two different amino acid substitutions in the ali-esterase E3 confer alternative types of organophosphorus insecticide resistance in the sheep blowfly，*Lucilia cuprina*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*，28：139 – 150.

Chen MH，Lan JY，Han ZJ，Qiao XF，Qu MJ，2006. Cloning and sequence analysis of carboxylesterase gene cDNA fragments from *Rhopalosiphum padi* Linnaeus. *Journal of Triticeae Crops*，26（4）：145 – 148.［陈茂华，蓝家样，韩召军，乔宪凤，曲明静，2006. 禾谷缢管蚜羧酸酯酶基因 cDNA 片段的克隆与序列分析. 麦类作物学报，26（4）：145 – 148］

Claudianos C，Kussel RJ，Oakeshott JG，1999. The same amino acid substitution in orthologous esterases confers organophosphate resistance on the house fly and a blowfly. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*，29：675 – 686.

Craig EW，Guomin S，James O，2005. Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides. *Journal of Pesticide Science*，30（2）：75 – 83.

Delroisse JM，Dannau M，Gilsoul JJ，EI Mejdou TE，Destain J，Portetelle D，Thonart P，Haubruge E，Vandenbol M，2005. Expression of a synthetic gene encoding a *Tribolium castaneum* carboxylesterase in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*，42：286 – 294.

Devonshire AL，1977. The properties of a carboxylesterase from the peach-potatoaphid，*Myzus persicae*（Sulz.），and its role in conferring insecticide resistance. *Biochemical Journal*，167：675 – 683.

Gao GT，Chen KP，Yao Q，Wang LL，Chen HQ，2006. Cloning and differential expression of *Bombyx mori* carboxylesterase gene. *Acta Entomologica Sinica*，49（6）：930 – 937.［高贵田，陈克平，姚勤，王林玲，陈慧卿，2006. 家蚕羧酸酯酶基因克隆及差异表达. 昆虫学报，49（6）：930 – 937］

Gao GT，Chen KP，Yao Q，Chen HQ，Wang LL，Xu JP，Zhao Y，Wang YJ，2007. Activity and differential display of carboxylesterase in *Bombyx mori* midgets of against BmDNV-Z. *Scientia Agricultura Sinica*，40（5）：1 042 – 1 049.［高贵田，陈克平，姚勤，陈慧卿，王林玲，徐家萍，赵远，王永杰，2007. 抗浓核病毒中国株家蚕品系中肠羧酸酯酶活力变化和基因表达差异的研究. 中国农业科学，40（5）：1 042 – 1 049］

Guo HL，Gao XW，2005. The mutation of carboxylesterase gene of cotton aphid，*Aphis gossypii* associated with omethoate resistance. *Acta Entomologica Sinica*，48（2）：194 – 202.［郭惠琳，高希武，2005. 棉蚜抗氧化乐果品系的羧酸酯酶基因突变. 昆虫学报，48（2）：194 – 202］

Karunaratne SHPP，Small GJ，Hemingway J，1999. Characterization of the elevated esterase-associated insecticide resistance mechanism in *Nilaparvata lugens*（Stål）and other planthopper species. *International Journal of Pest Management*，45：225 – 230.

Miller AD，Scott DF，Chacko TL，Maxwell DM，Schlager JJ，Lanclos KD，1999. Expression and partial purification of a recombinant secretory form of human liver carboxylesterase. *Protein Expression and Purification*，17（1）：16 – 25.

Miyazaki M，Kamiie K，Soeta S，Taira H，Yamashita T，2003. Molecular cloning and characterization of a novel carboxylesterase-like protein that is physiologically present at high concentrations in the urine of domestic cats（*Felis catus*）. *Biochemical Journal*，370（Pt 1）：101 – 110.

Mouches C，Pauplin Y，Agarwal M，Lemieux L，Herzog M，Abadon M，Beyssat-Arnaouty V，Hyrien O，de Saint Vincent BR，Georghiouii GP，Pasteur N，1990. Characterization of amplification core and esterase B1 gene responsible for insecticide resistance in *Culex*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*，87：2 574 – 2 578.

Sambrook J，Fritisch EF，Maniatis T（translated by Jin DY *et al*.），1999. Molecular Cloning：A Laboratory Manual. 2nd ed. Science Press，Beijing. 27，68，96.［J. 萨姆布鲁克，E.F. 弗里奇，T. 曼尼阿蒂斯著（金冬雁等译）. 1999. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 北京：科学出版社. 27，68，96］

Sarauer BL，Gillott C，Hegedus D，2003. Characterization of an intestinal mucin from the peritrophic matrix of the diamondback moth，*Plutella xylostella*. *Insect Molecular Biology*，12（4）：333 – 343.

Satoh T，Hosokawa M，1995. Molecular aspects of carboxylesterase isoforms in comparison with other esterases. *Toxicology Letters*，82 – 83：439 – 445.

Song HT，Li B，Wang D，Zhao HQ，Wang WB，Shen WD，2007. Cloning and sequence analysis of cDNA fragment of carboxylesterase gene in *Bombyx mandarina* M. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*，35（14）：4 112 – 4 114.［宋宏图，李兵，王东，赵华强，王文兵，沈卫德，2007. 野桑蚕羧酸酯酶基因 cDNA 片段的克隆及序列分析. 安徽农业科学，35（14）：4 112 – 4 114］

Sreerama L，Veerabhadrappa PS，1991. Purification and properties of

carboxylesterase from the mid-gut of the termite *Odontotermes horni* W. *Insect Biochemistry*, 21(8):833 – 844

Stok JE, Goloshchapov A, Song C, Wheelock CE, Derbel MB, Morisseau C, Hammock BD, 2004. Investigation of the role of a second conserved serine in carboxylesterases via site-directed mutagenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 430:247 – 255.

Teng X, Sun MJ, 2003. Advanced on carboxylesterase research. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 15(1):32 – 35. [**滕霞，孙曼霁**，2003. **羧酸酯酶研究进展**. **生命科学**，15(1):32 – 35]

Tomomi F, Masakiyo H, Tetsuo S, Kan C, 2004. Synergistic role of specificity proteins and upstream stimulatory factor 1 transactivation of the mouse carboxylesterase 2/microsomal acylcarnitine hydrolase gene promoter. *Biochemical Journal*, 384:101 – 110.

Vaughan A, Hawkes N, Hemingway J, 1997. Co-amplification explains linkage disequilibrium of two mosquito esterase genes in insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus*. *Biochemical Journal*, 325:359 – 365.

Vaughan A, Hemingway J, 1995. Mosquito Carboxylesterase Est alpha 2(1) (A2). Cloning and sequence of the full-length cDNA for a major insecticide resistance gene worldwide in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 (28): 17 044 – 17 049.

Villani F, White GB, Curtis CF, Miles SJ, 1983. Inheritance and activity of some esterases associated with organophosphate resistance in mosquitoes of the complex *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). *Bulletin of Entomological Research*, 73:153 – 166.

Wang P, Granados RR, 1997. Molecular cloning and sequencing of a novel invertebrate intestinal mucin cDNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(26):16 663 – 16 669.

Whyard S, Downe AE, Walker VK, 1994. Isolation of an esterase conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex tarsalis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 24 (8):819 – 827.

Whyard S, Downe AE, Walker VK, 1995. Characterization of a novel esterase conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex tarsalis*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 29 (4):329 – 342.

Wirth MC, Marquine M, Georghiou GP, Pasteur N, 1990. Esterase A2 and B2 in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae): role in organophosphate resistance and linkage. *Journal of Medical Entomology*, 27:202 – 206.

Yan B, Yang D, Bullock P, Parkinson A, 1995. Rat serum carboxylesterase: Cloning, expression, regulation, and evidence of secretion from liver. *Journal of Biological Chemistry*, 270(32):19 128 – 19 134.

Zhang YL, Gao XX, 2004. Research progress on biological control of beet armyworm. *Chinese Joumal of Pesiticides*, 43(5):209 – 211. [**张悦丽，高兴祥**，2004. **甜菜夜蛾生物防治研究进展**. **农药**，2004，43 (5):209 – 211]

(责任编辑：赵利辉)